

刘国军, 刘阳春, 刘志强. 阿片 μ 受体阻滞剂对习得性无助小鼠运动能力及抑郁、焦虑样行为的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(6): 770-777.

Liu GJ, Liu YC, Liu ZQ. Effects of μ opioid receptor blockers on motor ability and depressive and anxiety-like behavior in learned helplessness mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(6): 770-777.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.06.009

阿片 μ 受体阻滞剂对习得性无助小鼠运动能力及抑郁、焦虑样行为的影响

刘国军¹, 刘阳春^{2*}, 刘志强²

(1. 兰州市第三人民医院, 兰州 730050; 2. 陕西师范大学现代教学技术教育部重点实验室, 西安 710000)

【摘要】 目的 探讨阿片 μ 受体(μ opioid receptors, μ Rs)阻滞剂对习得性无助小鼠运动能力及行为的影响。**方法** 将小鼠随机分为学习-消退组、共轭组、对照组。在小鼠学习逃避电击刺激实验前进行 μ Rs 阻滞剂 β -FNA 或生理盐水(Sal)预处理。将小鼠在旷场实验中的运动距离进行 t 检验以观察小鼠的运动能力,通过穿梭箱、强迫游泳、高架十字迷宫、旷场等实验探究阻滞 μ Rs 后小鼠无助行为的变化。**结果** 两组小鼠较对照组运动距离无显著性差异;两组小鼠在 3 d 学习期内的被电击时间无差异;两组小鼠第 2 天与第 3 天的鼻触器触碰总次数具有显著性差异($P < 0.001$)。**结论** 阿片 μ 受体阻滞剂对习得性无助小鼠的运动能力无影响, μ Rs 在对小鼠的逃避厌恶刺激的行为形成过程中有着重要调节作用。

【关键词】 阿片 μ 受体;习得性无助;焦虑样行为;抑郁样行为;逃避行为;逃逸缺陷

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 06-0770-08

Effects of μ opioid receptor blockers on motor ability and depressive and anxiety-like behavior in learned helplessness mice

LIU Guojun¹, LIU Yangchun^{2*}, LIU Zhiqiang²

(1. the Third People's Hospital of Lanzhou, Lanzhou 730050, China. 2. Key Laboratory of Modern Teaching Technology, Ministry of Education, Shaanxi Normal University, Xi'an 710000)
Corresponding author: LIU Yangchun. E-mail: 925183965@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of μ opioid receptor (μ Rs) blockers on the exercise ability and behavior of learned helplessness mice. **Methods** Mice were randomly divided into a learning-regression group, conjugate group, and control group. Before the mice learned to avoid the electric shock stimulus experiment, the μ Rs blocker β -FNA or normal saline (Sal) was used to predict the treatment. Mouse movement distances in the open field experiment were compared by T test to determine the effect of the intervention on the mobility of mice. The helplessness behavior of mice after blocking μ Rs was investigated by shuttling box, forced swimming, elevated cross maze, and open field experiments. **Results** There was no significant difference in exercise distance between the two groups compared with the control group. There was no difference in the time of electric shock between the two treatment groups during the three-day learning period. There was a significant difference between the two treatment groups for the total number of times touching the nasal contact devices on the second and third days ($P < 0.001$). **Conclusions** The μ Rs blocker had no effect on the exercise ability of learned helplessness mice, and μ Rs played an important role in the formation of aversive behavior in mice.

【Keywords】 μ opioid receptors (μ Rs); learned helplessness; anxiety-like behavior; depression-like behavior; avoidance behavior; escape defect

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

[基金项目] 兰州市科技计划项目 (2022-3-55)。
Funded by Lanzhou Science and Technology Program Project (2022-3-55).
[作者简介] 刘国军 (1974—), 男, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 精神类疾病的临床与实验动物学研究。Email: guojunliu120@163.com
[通信作者] 刘阳春 (1994—), 女, 研究方向: 应用心理学。Email: 925183965@qq.com

习得性无助(learned helplessness, LH)是个体经历无法逃避或摆脱的反复痛苦或厌恶刺激后产生的心理状态和行为,是重度抑郁症(major depressive disorder, MDD)易感及发病的主要病因学成分,在这其中无助感则是维持 MDD 的主要心理病理学机制。习得性无助产生的无助感与绝望感可以引起机体产生一系列复杂的生理心理反应,这些反应往往会导致认知、情绪以及行为等功能改变,甚至会诱发焦虑症与抑郁症等严重的神经精神问题。常用的抑郁症动物模型有应激模型、药物诱导模型、脑损伤模型,其中应激模型是抑郁症研究中常用的动物模型,应激源包括水、电击、噪声等物理刺激,以及社会挫败、社会孤立等社会刺激^[1]。习得性无助动物模型是应激模型中应用较为广泛的一种,大多数症状可以通过多种快速抗抑郁药物得到治疗,因而此模型还可以用于筛选快速抗抑郁药物,具有良好的预测效度。习得性无助模型能够有效地模拟抑郁症中的无助现象,但其缺点是没有长期效果,大部分实验动物在一段时间后其行为学测验结果即恢复正常^[2]。2011 年, Pryce 等^[3]在描述失控与无助感时提出,要将个体对于厌恶事件的失控感发展成为无助感,其中的重要环节便是个体的失控感是由学习得来,强调这一过程中认知的参与,认为 LH 效应最为关键的是学习厌恶刺激不可控(learned aversive uncontrollability, LAU)。经典习得性无助动物模型无法体现出这一效应,因为动物是直接通过被动接受不可逃避电刺激获得无助感,在这一过程中没有 LAU 这一环节。LAU 首先需要获得对厌恶刺激的控制感,然后失去控制感。到目前为止,因为失去控制感而产生抑郁样状态的啮齿动物模型更接近人类的临床症状,因此习得性无助研究中实验对象使用啮齿类动物对于抑郁症的机理研究更有用。基于 LAU 对无助感形成的重要性,任维教授实验室提出了一种更为精细的实验设计^[4](见图 1)。

μ Rs 作为参与情绪调控的重要受体之一,在机体内分布广泛,尤其在认知、情绪有关脑区中有着高度表达。随着 μ Rs 研究的发展,人们利用不同类型动物模型证实了 μ Rs 在应激状态下对动物的情绪、认知状态有着重要调控作用,同时发现 μ Rs 与习得性无助行为有着密不可分的关系,但是因习得性无助复杂的神经机制以及习得性无助动物模型的局限性, μ Rs 对习得性无助的调控作用仍不明确。

近年来,随着生物技术以及实验模型逐步发展,人们已经可以培育出特定部位、特异细胞类型基因敲除鼠,这些技术及工具的成熟对于 μ Rs 调控情绪、认知以及其他生理、心理活动的研究十分有利。

本研究使用改良后的习得性无助 LOC 动物模型,在习得性无助形成的各个阶段利用 μ Rs 特异性阻滞剂干预,通过行为学实验观察野生小鼠及特定神经元上 μ Rs 敲除小鼠行为变化,以探究 μ Rs 对无助行为的调控作用及其神经机制,为进一步揭示无助感的神经机理及更深入的习得性无助研究奠定基础,以期对未来抑郁症的治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

成年 SPF 级(8 ~ 10 周)C57BL/6J 野生雄性小鼠 72 只,体重(23.0 ± 2.0)g,由陕西师范大学的 SPF 动物实验室提供【SCXK(陕)2020-002】。实验在陕西师范大学动物实验室进行【SYXK(陕)2020-003】,待动物到达可供实验的周龄后,将其从 SPF 动物房中取出饲养于普通动物房中,适应性饲养 7 d 后可作为正式实验动物,饲养期间自由进水、进食,实时观察记录动物摄食、体重、行为等基本情况,并严格遵守实验动物管理条例。饲养环境:明暗周期与自然昼夜交替一致(8:00 ~ 20:00 开灯,20:00 ~ 8:00 关灯),避免噪声和强光,保持通风换气,湿度恒定,温度(25 ± 1)℃,相对湿度为 30% ~ 40%。行为学实验进行时间段为 13:00 ~ 17:00,非实验期间动物可在笼内自由活动。动物通常 4 ~ 6 只/笼,摄食与饮水自由。所有实验操作均符合兰州市第三人民医院伦理学要求(AP2019070212)。

1.1.2 主要试剂

生理盐水(0.9% NaCl),本实验中作为 β -FNA 溶剂使用; β -FNA(β -funaltrexamin)(Tocris 公司)。 β -FNA(1 mg/mL)配置:称取 5 mg β -FNA,加入生理盐水 5 mL,震荡摇匀至完全溶解,溶液透明无悬浮物,用单道移液枪分装至离心管中,每管 1 mL, -20℃ 保存备用。使用剂量为 10 mg/kg,以 0.21 ~ 0.25 mL 腹腔注射。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组

本实验中的 WT(wild type)小鼠根据习得性无助 LOC 动物模型实验设计随机分为 3 组:学习-消

退组(LOC)、不经历学习-消退这一过程的共轭组(L-Yoked)、不经过模型训练的对照组(Control)。每组 24 只,共 72 只。在小鼠学习逃避电击刺激前对 3 组小鼠进行 μ Rs 阻滞剂 β -FNA 或生理盐水(Sal)预处理,每组 12 只,实验结束后最终纳入 72 只小鼠数据,分组如下:LOC- β -FNA; LOC-Sal; L-Yoked- β -FNA; L-Yoked-Sal; Control- β -FNA; Control-Sal。

1.2.2 实验仪器与方法

(1)实验仪器与设备

30 cm × 24 cm × 30 cm 的条件操作箱(图 1A)。实验箱放在隔绝外界噪声光线的装置中,底部由平行分布的细金属杆组成,金属杆与电击控制器连接,金属杆下方放置可取出清洗的排泄物底盘。实验箱内侧壁靠近底部的位置有 2 个 2 cm 的红外鼻触感器,2 个感应器一前一后分布在内侧壁上,间隔距离为 7 cm。鼻触器上方有小型音响设备,用于提示实验中电击被关闭。斯金纳箱与行为操作记录系统相连,通过软件控制斯金纳箱内金属杆产生电击,软件可以设置小鼠关闭电击的条件等。

(2)实验方法

采用任维教授实验室提出的方法。实验前检查斯金纳箱的清洁状态,确保处于清洁、无味的状态。实验分为 3 个阶段,分别是 1 d 适应期、3 d 学习期、3 d 消退期。每天的实验结束后将实验小鼠放回笼中,清理排泄物,用清水和 75% 乙醇擦拭斯金纳箱电击杆及内壁并晾干(图 1A)。

①1 d 适应期。正式实验前 24 h,开启斯金纳箱中的灯光和通风设备,将小鼠放入斯金纳箱中让其自由探索 100 min,记录小鼠在斯金纳箱中触碰鼻

触器次数,进行单因素方差分析,结果如图 1B 所示。学习-消退组、共轭组、对照组 3 组小鼠对于有效鼻触与无效鼻触碰次数均无显著差异,表明小鼠对于两个鼻触器无偏好。

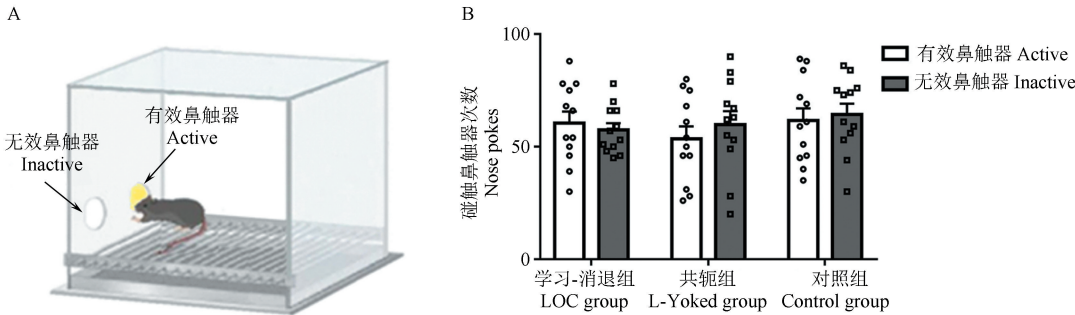
②3 d 学习期。当学习-消退组小鼠受到足底电击后(电击强度为 0.15 mA),可以通过触碰箱底部的有效鼻触(靠近内侧的鼻触器)关闭其所在的斯金纳箱与对应的共轭组小鼠所在斯金纳箱中的电击,这时记录 1 次电击试次;如果学习-消退组小鼠在探索过程中未能触碰有效鼻触,电击持续 120 s 后自动停止,记录 1 次电击试次,共轭组小鼠在这个过程中无法控制电击。1 次电击试次结束后会有 30 ~ 60 s 的随机不应期时间,不应期结束后足底电击再次出现,所有小鼠在进行为期 3 d 每天 50 试次循环电击实验。实验期间通过软件后台记录小鼠被电击时间以及触碰鼻触器次数。

③3 d 消退期:实验时间与前两个阶段保持一致,但在足底电击期间所有小鼠不能通过任何行为关闭电击,电击 600 s 后自动停止,接着进行 600 s 的休息,期间无足底电击。休息结束后进行 600 s 的足底电击实验,循环 5 次后程序结束,共进行 3 d 实验。实验期间通过软件后台记录小鼠每 600 s 电击期触碰有效、无效鼻触器次数。

④数据分析:实验小鼠逃避厌恶刺激学习行为通过统计 3 d 被电击的时间比较得出;实验小鼠消退行为通过统计触碰鼻触器次数得出。

1.3 统计学分析

本实验利用 Graphpad Prism 7、SPSS 20.0 软件进行数据统计与分析。数据用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用独立样本 *t* 检验、重复测量方差分



注:A:斯金纳箱装置示意图;B:小鼠在 100 min 适应期内触碰有效/无效鼻触器次数,小鼠对于有效鼻触与无效鼻触无显著偏好。

图 1 斯金纳箱装置及小鼠适应期活动情况($\bar{x} \pm s, n = 24$)

Note. A. Schematic diagram of the Skinner box device. B. Number of effective/ineffective nose pokes touched by the mouse during the 100 min adaptation period. There was no significant preference for effective and ineffective nose pokes of mice.

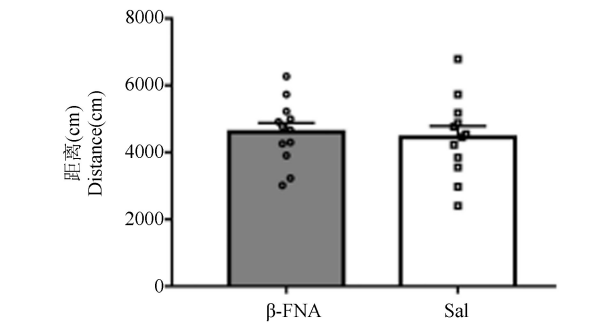
Figure 1 Skinner box device and mouse adaptation period activities($\bar{x} \pm s, n = 24$)

析 (Two-way Repeated Measures ANOVA)、多因素方差分析 (Two-way ANOVA) 进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。数据展示采用统计图的方式, 统计图采用 Graphpad Prism 7 软件制作完成。

2 结果

2.1 阿片 μ 受体阻滞剂对小鼠运动能力的影响

本实验中采用腹腔注射 μ Rs 阻滞剂 β -FNA 进行习得性无助行为研究, 为观察阻滞剂以及生理盐水的注射对小鼠运动能力的影响, 将小鼠在旷场实验中的运动距离进行 t 检验。两组小鼠的运动距离无显著性差异 ($t(22) = 0.366, P = 0.718$), 表明阻滞剂对小鼠的运动能力无影响 (见图 2)。



注: β -FNA:腹腔注射 10 mg/kg β -FNA;Sal:腹腔注射 10 mg/kg 生理盐水。

图 2 药物注射对小鼠运动距离的影响
Note. β -FNA. Systemic injection of 10 mg/kg β -FNA. Sal. Systemic injection of 10 mg/kg saline.

Figure 2 Effects of drug injection on the movement distance of mice

2.2 小鼠学习逃避厌恶刺激前阻断阿片 μ 受体对行为的影响

在学习阶段前 1 h 腹腔注射 β -FNA (10 mg/kg) 或 Sal, 对学习-消退组小鼠每天被电击的总时间进行统计 (图 3A), 以探究 μ Rs 对小鼠学习逃避厌恶刺激的影响。重复测量方差分析结果显示, 学习时间主效应有显著性差异 ($F(2, 47) = 56.573, P < 0.001, \eta^2 = 0.72$), 药物主效应无显著性差异 ($F(1, 47) = 2.68, P = 0.116, \eta^2 = 0.109$), 学习天数与药物交互作用无显著性差异 ($F(2, 47) = 0.581, P = 0.564, \eta^2 = 0.026$), 表明两组小鼠在 3 d 的学习期内均能学会触碰有效鼻触器关闭电击, 阻断 μ Rs 对学习逃避厌恶刺激行为无影响。

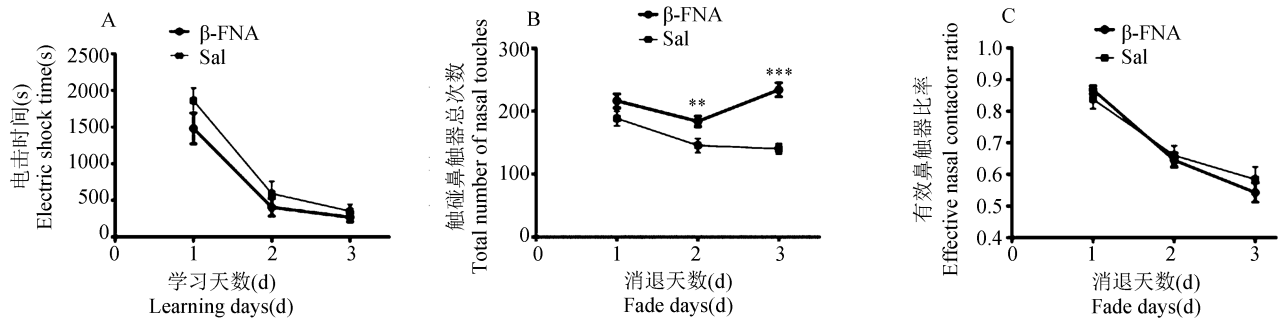
观察在学习阶段前注射 β -FNA (10 mg/kg) 或 Sal 对消退阶段总鼻触器次数 (有效鼻触次数 + 无效鼻触次数) 的影响 (图 3B)。重复测量方差分析

显示, 消退天数主效应具有显著性差异 ($F(2, 23) = 7.334, P = 0.003, \eta^2 = 0.250$), 药物注射主效应具有显著性差异 ($F(1, 23) = 30.998, P < 0.001, \eta^2 = 0.585$), 消退天数与药物注射交互作用具有显著性差异 ($F(2, 23) = 6.382, P = 0.006, \eta^2 = 0.225$)。简单效应分析知, β -FNA 组小鼠消退阶段的第 1 天鼻触器总次数与第 2 天具有显著性差异 ($P = 0.037$), Sal 组小鼠消退阶段第 1 天鼻触器总次数与第 2 天 ($P = 0.007$) 及第 3 天均具有显著性差异 ($P = 0.014$), 表明两组小鼠碰触鼻触器行为均被消退。注射 β -FNA 小鼠在消退阶段的第 2 天 ($P = 0.013$) 及第 3 天 ($P < 0.001$) 鼻触器触碰总次数均显著多于注射 Sal 小鼠, 表明在逃避厌恶刺激消退阶段, 阻断 μ Rs 对小鼠触碰鼻触器行为有影响。

消退阶段主要目的是消退小鼠触碰鼻触器行为, 为进一步评估逃避厌恶刺激行为的消退效果以及 μ Rs 对行为消退的影响, 对消退阶段有效鼻触器比率 (有效鼻触器次数 / (有效鼻触器次数 + 无效鼻触器次数)) 进行统计 (图 3C)。重复测量方差分析显示, 消退天数主效应显著 ($F(2, 23) = 54.889, P < 0.001, \eta^2 = 0.714$), 药物注射主效应不显著 ($F(1, 23) = 0.12, P = 0.733, \eta^2 = 0.005$), 消退天数与药物注射交互作用不显著 ($F(2, 23) = 0.814, P = 0.449, \eta^2 = 0.036$), 表明在消退阶段, 两组小鼠有效鼻触器的偏好行为均消退, 阻断 μ Rs 对小鼠有效鼻触器消退效果无显著影响。

为探究学习逃避厌恶刺激前阻断 μ Rs 对小鼠习得性无助行为的影响, 在 6 d 的模型建立完成后, 对小鼠进行旷场、穿梭箱、强迫游泳、高架十字迷宫等行为实验。

为评估小鼠无助行为, 对穿梭箱实验中小鼠的逃逸潜伏期进行统计 (图 4A)。方差分析结果显示, 逃避厌恶刺激主效应具有显著性差异 ($F_{(2, 71)} = 306.528, P < 0.001, \eta_p^2 = 0.903$), 药物处理主效应具有显著性差异 ($F_{(1, 71)} = 47.805, P < 0.001, \eta_p^2 = 0.420$), 逃避厌恶刺激与药物处理交互作用具有显著性差异 ($F_{(2, 71)} = 8.084, P = 0.001, \eta_p^2 = 0.197$)。简单效应分析结果显示, 对于注射 Sal 的小鼠而言, 消退组逃逸潜伏期 ($P < 0.001$) 与共轭小鼠逃逸潜伏期 ($P < 0.001$) 均显著多于对照组, 表明小鼠经历电击后均表现出逃逸缺陷行为, 同时消退组逃逸潜伏期显著多于共轭组 ($P < 0.001$), 表明



注: β-FNA: 学习逃避厌恶刺激前腹腔注射 10 mg/kg; Sal: 为学习逃避厌恶刺激前腹腔注射生理盐水; 与 Sal 相比, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。(下图同)

图 3 学习阶段阻断 μ R 对小鼠逃避学习行为以及消退行为的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Note. β-FNA. Injected intraperitoneally at 10 mg/kg before learning to avoid aversion stimulation. Sal. Injected intraperitoneally with saline before learning to escape aversion. Compared with Sal, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. (The same in the following figure)

Figure 3 Effects of blockage of μ R in the learning phase on evasion and escape behavior of mice ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

有 LAU 经验小鼠的逃逸缺陷行为更严重。注射 β-FNA 阻断 μ R 后,消退组小鼠逃逸潜伏期 ($P < 0.001$) 及共轭组小鼠逃逸潜伏期 ($P = 0.001$) 均显著多于对照小鼠,表明即使阻断 μ R,小鼠经历电击后仍会表现出逃逸缺陷行为,与此同时学习-消退组小鼠逃逸潜伏期显著多于共轭组小鼠 ($P < 0.001$),表明阻断 μ R 后,LAU 经验小鼠同样会导致更严重的逃逸缺陷行为。对照组中 β-FNA 小鼠逃逸潜伏期与 Sal 小鼠无显著性差异 ($P = 0.427$),表明 β-FNA 或 Sal 的注射对无电击经历小鼠逃逸行为无影响。然而,有 LAU 经验的学习-消退组中,β-FNA 小鼠逃逸潜伏期显著少于 Sal 小鼠 ($P < 0.001$),无 LAU 经验的共轭组中,β-FNA 小鼠逃逸潜伏期同样显著少于 Sal 小鼠 ($P < 0.001$),表明即使厌恶刺激逃避经验不同, μ R 对厌恶刺激引发的逃逸缺陷行为同样有影响。

为评估小鼠抑郁样行为,对强迫游泳实验中小鼠后 4 min 不动时间进行统计(图 4B),方差分析结果显示,逃避厌恶刺激主效应显著 ($F_{(2,71)} = 119.866, P < 0.001, \eta_p^2 = 0.784$),药物处理主效应显著 ($F_{(1,71)} = 96.132, P < 0.001, \eta_p^2 = 0.593$),逃避厌恶刺激与药物处理交互作用显著 ($F_{(2,71)} = 9.530, P < 0.001, \eta_p^2 = 0.472$)。简单效应分析结果显示,注射 SAL 后,学习-消退组不动时间 ($P < 0.001$)、共轭组不动时间 ($P < 0.001$) 均显著多于对照组,表明小鼠经历电击后均表现出抑郁样行为,同时学习-消退组不动时间显著多于共轭组小鼠 ($P < 0.001$),表明有 LAU 经验小鼠抑郁样行为更严重。注射 β-FNA 阻断 μ R 后,学习-消退

组小鼠不动时间显著多于对照小鼠 ($P < 0.001$),而共轭组与对照小鼠不动时间无显著性差异 ($P = 0.511$),同时学习-消退组小鼠不动时间显著多于共轭组小鼠 ($P < 0.001$),表明阻断 μ R 后,LAU 经验对于抑郁样行为的形成十分重要。对照组中 β-FNA 小鼠逃逸潜伏期与 Sal 小鼠无显著性差异 ($P = 0.932$),表明 β-FNA 或 Sal 的注射对无电击经历小鼠的抑郁样行为无影响。然而在学习-消退组中,β-FNA 小鼠不动时间显著少于 Sal 小鼠 ($P < 0.001$),共轭组中 β-FNA 小鼠不动时间同样显著少于 Sal 小鼠 ($P < 0.001$),表明即使厌恶刺激逃避经验不同, μ R 对厌恶刺激引发的小鼠抑郁样行为同样具有调控作用。

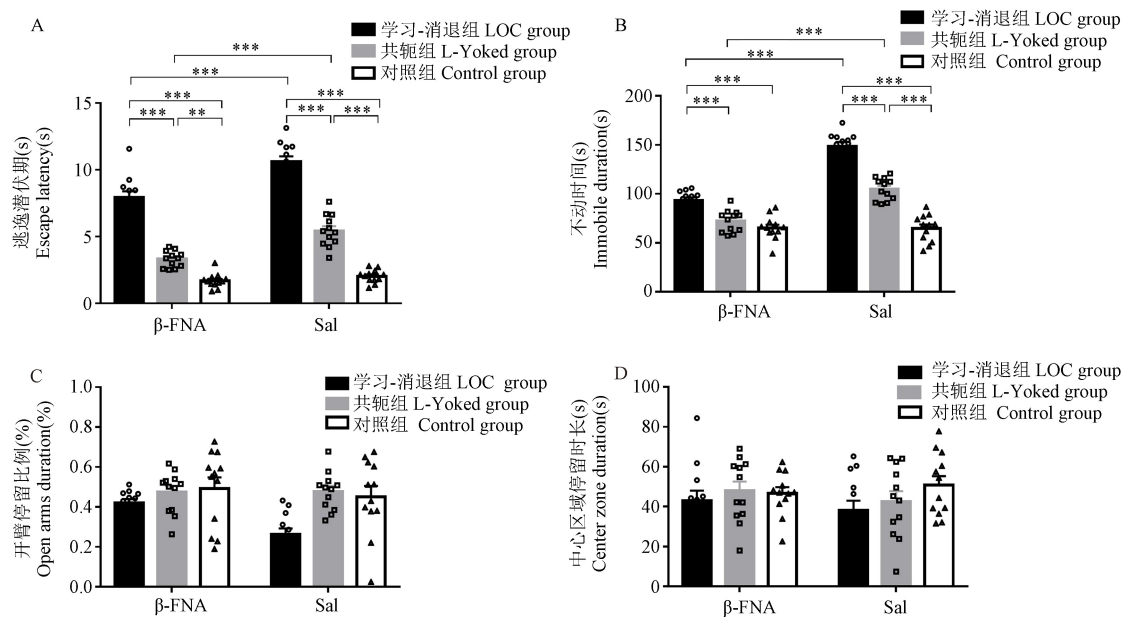
为评估小鼠焦虑样行为,对高架十字迷宫实验开臂比例结果统计(图 4C),方差分析结果显示,小鼠逃避学习行为主效应显著 ($F_{(2,35)} = 7.751, P = 0.001, \eta_p^2 = 0.190$),药物注射主效应显著 ($F_{(1,35)} = 4.333, P = 0.041, \eta_p^2 = 0.062$),逃避学习行为与药物注射交互作用不显著 ($F_{(2,35)} = 2.285, P = 0.110, \eta_p^2 = 0.065$)。事后检验分析发现,学习-消退组小鼠开臂比例显著少于共轭组 ($P = 0.001$) 及对照组 ($P = 0.001$),表明厌恶刺激逃避经验会对小鼠的焦虑样行为产生影响。注射 β-FNA 小鼠开臂比例显著多于注射 Sal 小鼠,表明 μ R 参与小鼠的焦虑样行为的调节。

为评估小鼠焦虑样行为,对小鼠在旷场实验中心区域停留时间进行统计(图 4D),方差分析结果显示,小鼠逃避学习行为主效应不显著 ($F_{(2,35)} = 1.573, P = 0.215, \eta_p^2 = 0.045$),药物注射主效应

不显著 ($F_{(1,35)} = 0.295, P = 0.589, \eta_p^2 = 0.004$), 逃避学习行为与药物注射交互作用不显著 ($F_{(2,35)} = 0.664, P = 0.518, \eta_p^2 = 0.02$), 表明动物经历电刺激后未产生焦虑样行为。

本部分实验结果主要通过在学习阶段前注射 μ Rs 特异性阻滞剂 β -FNA, 观察阻断 μ Rs 后小鼠逃避厌恶刺激学习情况以及消退阶段表现, 探究 μ Rs 对习得性无助行为的影响。从结果可以看出, 注射

Sal 的小鼠表现出逃避缺陷行为, 控制厌恶刺激的尝试行为更少, 同时伴有焦虑样、抑郁样行为。在学习阶段前阻断 μ Rs 虽然对小鼠习得逃避厌恶刺激行为无影响, 但对消退行为有影响, 小鼠控制厌恶刺激的尝试行为更多。在模型建立完成后, 阻断 μ Rs 的小鼠逃逸缺陷行为较 Sal 小鼠减少, 抑郁样行为减少, 表明 μ Rs 在习得性无助行为形成过程中发挥重要调节作用。



注:A:穿梭箱实验中逃逸潜伏期;B:强迫游泳实验后4 min 不动时间;C:高架十字迷宫实验中开臂比例;D:小鼠进行旷场实验中心区域运动时长;与 Sal 相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 4 逃避厌恶刺激学习之前注射药物对小鼠习得性无助行为的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Note. A. Escape latency results of mice. B. Last 4 minutes immobile duration results of mice in forced swimming test. C. Ratio of open arms of mice in elevated cross-maze tests. D. Length of center zone duration in the open field tests. Compared with Sal, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 4 Effects of systemic injection with β -FNA before learning phase ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

3 讨论

抑郁症的发病复杂, 目前对于其发病机制仍然不清楚。针对其发病机制, 目前的药物研究各有优缺点, 其中有的是针对体内炎症反应、有的是对于单胺类神经递质如 5-HT 和 DA 浓度的研究, 还有对于维持 HPA 轴及神经营养因子的内稳态、以及应激反应应答等方面的相关研究等。目前的药物研究各有优缺点。阿片 μ 受体是一种 G 蛋白耦联受体, 在纹状体、海马、前额叶皮质 (prefrontal cortex, PFC)、伏隔核等脑区广泛存在; 内源性阿片系统是参与应激之后情感和行为反应的重要媒介, 主要包括内啡肽、脑啡肽和强啡肽及其受体 μ 、 δ 和 κ 阿片受体。激动 μ 阿片受体和 δ 阿片受体能够提升情

绪, 激动 κ 阿片受体却会引起焦躁不安和抑郁样行为等负性情绪。

穿梭箱、强迫游泳、高架十字迷宫、旷场实验常用于动物行为学实验研究, 用于评价实验动物尤其是啮齿类动物的自发活动行为和探索行为, 在神经学与精神药理学领域研究中可用于检测药物是否对行为的影响等; 强迫游泳实验, 是研究啮齿类动物抑郁样行为最常用的方法之一。

为探究 μ Rs 对习得性无助小鼠行为的影响, 在动物进行厌恶刺激逃避学习前阻断 μ Rs 的活动, 结果显示动物的逃避厌恶刺激学习行为以及相关记忆的消退并未受到影响。

内源性阿片系统参与学习记忆的加工、存储过程, 并在其中有着重要调节作用。在水迷宫实验

中,发现吗啡会减慢大鼠记忆获取能力;阿片激动剂会破坏记忆的保持,其阻断剂可以增强记忆的保持。但在本研究中,阻滞剂并未使小鼠在学习逃避厌恶刺激过程中的电击时间增强,并且消退效果与对照小鼠也无显著性差异,表明小鼠“刺激-反应”的联结学习以及消退并未受到影响。出现这一结果的可能原因是本研究中的学习行为更多反应的是动物在学习过程中将刺激与反应结合在一起的联结学习,与前人研究中的空间学习记忆或任务执行类的学习以及记忆提取方式不同,提示在不同类型的学习记忆中, μ Rs 的调控作用是不同的^[3]。

在本研究中,主要通过全身给药系统地描述 μ Rs 对动物的学习行为的影响,对所熟知的与学习记忆密不可分的海马脑区关注较少,因此,在后续研究中,要细致地刻画动物的学习行为,对于具体脑区的研究是不可缺少的。

尽管在逃避厌恶刺激学习前阻断 μ Rs 对小鼠学习逃避厌恶刺激以及有关记忆消退无影响,但当厌恶刺激无法逃避时,小鼠的尝试行为较对照小鼠明显更多,并且在测试阶段表现出更少的异常行为,其中的原因可能是 β -FNA 属于长效阻滞剂,小鼠在行为消退过程中,甚至在测试过程中,仍然在发挥着阻滞作用。为了进一步探究 μ Rs 对小鼠逃避厌恶刺激行为消退的影响,本研究在消退阶段前阻断 μ Rs,结果显示小鼠碰触尝试行为显著多于对照小鼠,并且阻滞剂并未对小鼠运动能力造成影响,表明 μ Rs 对小鼠的尝试行为有调控作用。

早在 1988 年,Tariot 等^[5]利用双盲实验探究内源性阿片系统对认知及行为调节作用中,采用静脉注射 μ Rs 激动剂的方法发现只有剂量达到 2 mg/kg 时,健康被试才产生认知障碍,表明 μ Rs 对于认知具有调控作用,并且这种影响是依赖于剂量的。在精神分裂小鼠动物模型中,郝俊国^[6]发现 β -FNA 对精神分裂小鼠的探洞行为有一定的改善作用,并使其基本恢复到正常小鼠的探洞次数,证实了 μ Rs 对小鼠认知能力的调控作用。在啮齿类动物研究中,Pattij 等^[7]利用动物进行 5-选择序列反应时发现,随着吗啡注射计量的增加,动物的过早反应率增加、注意力下降,而阿片拮抗剂纳洛酮使动物的过早反应率下降,注意力持续时间增长。Maguire 等^[8]通过每天注射选择性 μ Rs 激动剂吗啡,发现动物在 5-选择序列反应中的遗漏率以及错误率显著增加,并且损害动物在执行任务过程中的注意力,表明 μ Rs 的

激活对有关注意力、判断力以及决策能力任务的执行是不利的。在本研究中, β -FNA 小鼠触碰鼻触器次数的增加也证实了 μ Rs 对于习得性无助形成过程中动物认知能力的影响。此外,Shannon 等^[9]在选择序列反应中利用 κ Rs 激动剂发现动物出现注意力缺陷的现象,主要表现在动物反应速度以及产生反应行为的可能性降低,说明 κ Rs 的活性与动物的行为产生可能性密不可分。在本研究中,动物触碰鼻触器关闭电击的成功经验与触碰鼻触器无法关闭电击的现实环境产生了冲突,在这个过程中动物通过判断决策产生行为, μ Rs 的阻断使动物在原有经验基础上产生更多可能改变结果的行为, κ Rs 与 μ Rs 的同向调控作用支持了先前研究者们使用非特异性拮抗剂改善动物任务执行效果的实验结果。此外,研究人员认为阿片系统参与奖励过程中快感的产生,结合内源性阿片系统在决策中发挥着重要^[10]以及对奖励过程中基于价值的行为决策^[11]的影响以及本研究的实验结果,猜测 μ Rs 参与高级认知活动,并在其中起着重要调控作用。

在本研究中,使用简单的方法使动物已有的成功经验得到消退,利用鼻触器触碰次数作为指标,发现了 μ Rs 在其中的调控作用,但对于 μ Rs 是如何影响信息的加工过程以及判断决策却知之甚少,因此需要设计出更加精密巧妙的实验设计,给动物提供更加丰富的环境以及多样化的选择,利用多种评估手法进行研究,这样更有利于进一步了解 μ Rs 在高级认知功能中的调控作用。

Ide 等^[12]发现,阿片 μ 受体敲除小鼠在压力应激后,强迫游泳实验中不动时间少于对照小鼠,在高架十字迷宫实验中的探索时间多于对照组,表明阿片 μ 受体的激活与动物表现出抑郁样行为有关。Komatsu 等^[13]发现与正常对照组小鼠相比,压力应激组小鼠海马内脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)水平显著降低,而阿片 μ 受体敲除小鼠则消除了这种变化,阿片 μ 受体敲除小鼠与正常对照组小鼠相比 BDNF 水平无差异。通过慢性不可预测性温和应激造模的抑郁动物,与正常组对比,阿片 μ 受体信使 RNA 及阿片肽表达量差异有统计学意义^[14]。给予大鼠阿片 μ 受体激动剂后,大鼠体内 DA 和 5-HT 水平明显升高,抑郁样行为学明显改善^[15]。以上数据皆表明,阿片 μ 受体在与压力相关的抑郁症发病机制中具有重要作用。本研究的实验数据也显示出同样结论。阻断阿片 μ

受体后,小鼠在穿梭箱中的逃逸潜伏期显著少于对照小鼠,在强迫游泳实验中的不动时间同样显著少于对照小鼠,表明利用电击模拟的压力环境中,阿片 μ 受体的激活会增强动物的无助感及异常情绪。

本研究结合心理学理论,利用野生鼠及基因敲除鼠进行习得性无助造模,通过药物干预、基因敲除等手段探讨 μ Rs 对于习得性无助行为的影响。得出的结论如下:(1) μ Rs 参与无助感产生过程中的尝试行为。阻断 μ Rs 后,动物试图改变结果的行为增加,预示 μ Rs 可能影响动物产生行为的动机。(2) μ Rs 增强无助感及异常情绪。在无助感形成前阻断 μ Rs 的动物表现出无助行为减少,抑郁样、焦虑样行为减少,预示 μ Rs 对无助感可能同时具有治疗和预防作用。

参 考 文 献(References)

- [1] Hernández JI, Márquez-Herrero S, Soler O, et al. Animal models of depression: validation criteria and relevance in translational experimental neurobiology [M]. Psychiatry and Neuroscience Update. Cham; Springer International Publishing; 2018.
- [2] Cryan JF, Markou A, Lucki I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs [J]. Trends Pharmacol Sci, 2002, 23(5): 238–245.
- [3] Pryce CR, Azzinnari D, Spinelli S, et al. Helplessness: a systematic translational review of theory and evidence for its relevance to understanding and treating depression [J]. Pharmacol Ther, 2011, 132(3): 242–267.
- [4] Yao L, Li Y, Qian Z, et al. Loss of control over mild aversive events produces significant helplessness in mice [J]. Behav Brain Res, 2019, 376: 112173.
- [5] Tariot PN, Gross M, Sunderland T, et al. High-dose naloxone in older normal subjects: implications for Alzheimer's disease [J]. J Am Geriatr Soc, 1988, 36(8): 681–686.
- [6] 郝俊国. 利用小鼠模型进行抗精神分裂症新药的筛选研究 [D]. 上海: 中国科学院研究生院(上海生命科学研究院); 2005.
- Hao JG. Study on screening of new antischizophrenic drugs using mouse model [D]. Shanghai: Shanghai Institutes for Biological Sciences; 2005.
- [7] Pattij T, Schetters D, Janssen MCW, et al. Acute effects of morphine on distinct forms of impulsive behavior in rats [J]. Psychopharmacology, 2009, 205(3): 489–502.
- [8] Maguire DR, Henson C, France CP. Daily morphine administration increases impulsivity in rats responding under a 5-choice serial reaction time task [J]. Br J Pharmacol, 2016, 173(8): 1350–1362.
- [9] Shannon HE, Eberle EL, Mitch CH, et al. Effects of kappa opioid receptor agonists on attention as assessed by a 5-choice serial reaction time task in rats [J]. Neuropharmacology, 2007, 53(8): 930–941.
- [10] Chamberlain SR, Mogg K, Bradley BP, et al. Effects of mu opioid receptor antagonism on cognition in obese binge-eating individuals [J]. Psychopharmacology, 2012, 224(4): 501–509.
- [11] Bari A, Dalley JW, Robbins TW. The application of the 5-choice serial reaction time task for the assessment of visual attentional processes and impulse control in rats [J]. Nat Protoc, 2008, 3(5): 759–767.
- [12] Ide S, Sora I, Ikeda K, et al. Reduced emotional and corticosterone responses to stress in mu-opioid receptor knockout mice [J]. Neuropharmacology, 2010, 58(1): 241–247.
- [13] Komatsu H, Ohara A, Sasaki K, et al. Decreased response to social defeat stress in μ -opioid-receptor knockout mice [J]. Pharmacol Biochem Behav, 2011, 99(4): 676–682.
- [14] 李伟卓. 额叶脑啡肽/强啡肽及其受体在抑郁症中的改变及 MOR 受体在慢性应激早期阶段的作用 [D]. 大连: 大连医科大学; 2018.
- Li WZ. PENK/PDYN and their receptors in the frontal cortex in depression and the role of MOR in the early stage of chronic stress [D]. Dalian: Dalian Medical University; 2018.
- [15] Lutz PE, Kieffer BL. Opioid receptors: distinct roles in mood disorders [J]. Trends Neurosci, 2013, 36(3): 195–206.

[收稿日期] 2022-06-21